



TITLE:

# D-アミノ酸酸化酵素反応中間体に関する研究( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

岡村, 研太郎

---

CITATION:

岡村, 研太郎. D-アミノ酸酸化酵素反応中間体に関する研究. 京都大学, 1966, 薬学博士

ISSUE DATE:

1966-09-27

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/212006>

RIGHT:

氏 名	岡 村 研 太 郎 お か む ら け ん た ろ う
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 40 号
学位授与の日付	昭 和 41 年 9 月 27 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	<b>D-アミノ酸酸化酵素反応中間体に関する研究</b>

論文調査委員 (主 査)  
教 授 山 科 郁 男 教 授 上 尾 庄 次 郎 教 授 富 田 謙 吉

### 論 文 内 容 の 要 旨

D- アミノ酸酸化酵素の反応中間体の性状については、各研究者間で異なった研究結果がえられ、混乱をまねいていた。著者は中間体の性状を実験的に明確とし中間体が電荷移動複合体ならびにその解離生成物であるという推論を下した。また本酵素の完全還元型を最初に結晶状に単離し、中間体と関連づけた。これらの結果は本酵素の反応機構解明に重要な知見をもたらしたものである。

#### (1) D- アミノ酸酸化酵素の反応における 2 種の中間体の存在について

久保、中村、Massey らは本酵素に反応生成物を共存させ基質で還元するか、逆に基質で還元したのち、反応生成物を添加すると 550 m $\mu$  付近に幅広いスペクトルをもつ物質を生ずることを見出した。八木は酵素に過剰の生成物と基質を嫌氣的に加え、冷暗所に静置し、492 m $\mu$  に吸収極大のある物質を結晶状に分離した。著者は八木らの結晶化の過程を追究し、最初 550 m $\mu$  付近に幅広い吸収スペクトルをもつ物質（これを仮に 550 型と呼ぶ）が生じ、静置により 492 m $\mu$  に吸収極大をもつ物質に変化することを見出した（これを仮に 492 型と呼ぶ）。従って、中間体には 2 種存在することとなる。

#### (2) 還元型結晶の単離について

本酵素に基質の多量を加えて還元するか、あるいはデチオナイトで還元すると淡黄色の完全還元型となる。著者はこの完全還元型酵素を結晶状に分離し、その性質について検討を加え、更にこの物が 550 型に移行することを証明した。

#### (3) 反応中間体の性質

##### a) 反応中間体とトリクロル酢酸との反応

492 型の結晶および溶液には不対電子が観測され、遊離基の存在が予想される。著者はこれに対する化学的な傍証を試み、492 型の結晶に嫌氣的にトリクロル酢酸を加えて赤色の補酵素を分離し、吸収スペクトル、ESR 測定から、これが Kuhn によるロドフラビンと同じ物質であることを明らかとした。トリクロル酢酸添加により還元型は呈色しない。550 型は呈色するからこの操作で補酵素部分がセミキノン型に

変化し呈色したと考える。

#### b) 電子スピン共鳴の測定

550型, 492型, 還元型などについて電子スピン共鳴を測定し, スピン量を定量した。この結果 550 型, 還元型ではシグナルが認められず, 静置した 492 型ではその静置日数とスピン量との間に平行関係が認められた。デチオナイトによって得られるセミキノン型酵素には FAD あたりほぼ定量的にスピンの観測された。

#### c) 中間体と安息香酸との反応

550型に嫌氣的に安息香酸を添加したのち, 前後のスペクトルを測定することにより, 550型は定量的に酸化型酵素安息香酸補合体になることがわかった。このことは 550 型がこの操作で基質に電子をもどし酸化型にもどったことを示す。静置により生じた 492 型では酸化型の生成が部分的であり, 添加前後のスピン量も変化せずセミキノン型の混在が示される。還元型, デチオナイトによるセミキノン型などは酸化型にならない。

#### d) 中間体の旋光分散の測定

550型は  $430\text{ m}\mu$  に谷をもつ負のコットン効果を示す。酵素安息香酸複合体は  $380\text{ m}\mu$  に正のコットン効果を示すから 550 型では基質が結合し電子が移動したことを示すと考えられる。静置した 492 型も同じ負のコットン効果を示すが  $430\text{ m}\mu$  の谷は静置日数により減少し,  $492\text{ m}\mu$  の吸光度, スピン量は上昇する。デチオナイトによるセミキノン型, 還元型には異常分散は認められない。これらは基質が結合していないか, していても不斉性を示さないような状態であることを示している。

### (4) 結 論

中間体に関する吸収スペクトル, ESR, 旋光分散などの測定から, 電子供与体 (D) から電子受容体 (A) に電荷移動を生じて 550 型となり ( $A^-D^+$ ), これが静置によりまたは光により解離を起し ( $A^- + D^+$ ) となってセミキノン型酵素が貯積し 492 型を生じたと考えられる。還元型は  $A^-D^+$  から反応が進み還元型酵素と生成物に分離したのち, 新たな基質が結合したものであろう。

## 論文審査の結果の要旨

酸化還元酵素の作用に於ける基質と補酵素との反応の微細な機作は未だ明らかにされていない。本論文は D-アミノ酸酸化酵素に関して, 反応中間体を単離しつつ反応の機作を明らかにせんとしたものである。

酵素反応中間体の研究には, 従来, 反応中の補酵素のスペクトル変化を迅速に追跡して間接的に中間体の性質を推定するか, あるいは酵素反応を至適条件からずらして緩徐に進行せしめ, 反応中間体を単離したのち, その性質を明らかにするかのいずれかの方法がとられていた。

本論文は後者の方法によって, 反応中間体と思われる 2 種の結晶を得たのち, それぞれについて吸収スペクトル, 電子スピン共鳴, 旋光分散を測定して, 補酵素とそれに結合した基質の電子状態を論じている。

他の研究者によって従来得られていた反応中間体に関する知見は, あるものは電子スピン共鳴シグナル

を示さず、またあるものはこれを有するセミキノン型であるなど、互いに矛盾したものであった。

本論文の著者は反応中間体と思われるものには少なくとも2種類あり、最初に生ずる550型が放置によりゆっくりと492型に変わることをはじめて明らかにし、従来の矛盾を解決した。すなわち、550型は電子スピン共鳴シグナルを示さず、いわゆる電荷移動型複合体であり、492型は電子スピン共鳴シグナルを有し、セミキノン型補酵素を有するものが主体であると推定されるに至った。この推定はトリクロル酢酸、過酸化水素を用いての化学的研究の結果とも矛盾せず、さらに、著者によってはじめて結晶状に単離された完全還元型酵素、さらにセミキノン型酵素と基質あるいは反応生成物との結合物の性質もまた上述の推定とよく一致する。

かくて、D-アミノ酸酸化酵素はその正逆両反応において基質と電荷移動型複合体をつくり、これはセミキノン型と可逆的な関係にあると結論された。

以上、本論文は酸化還元酵素の作用機作の解明にきわめて有益な結論を含むものであり、薬学博士の学位論文として価値あるものと認定する。